麻痹性贝毒生物合成机制的研究进展和蛋白组学的应用

李谷静　(厦门大学环境科学研究中心,福建厦门 361005)

摘要　分别介绍麻痹性贝毒生物合成机制的重大研究进展和蛋白组学在该研究中的应用。目前对蓝藻的毒素生物合成机制已有了较为深入的了解;通过蛋白组学的应用,甲藻的毒素生物合成机制研究也有了初步进展。

关键词　麻痹性贝毒;生物合成机制;蛋白组学
中图分类号　X145　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　0517 - 6611(2011)20 - 12243 - 03

Review on Research Progress of Paralytic Shell Poison Biosynthesis and Application of Proteomics

LI Gu-jing　(Research Center of Environmental Science, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005)

Abstract　The research progress of paralytic shell poison biosynthesis and application of proteomics were introduced. There has been in-depth understanding of biosynthesis pathways in cyanobacteria now; through the application of proteomics, there is some preliminary progress in the same research in harmful dinoflagellates.

Key words　Paralytic shell poison; Biosynthesis; Proteomics

淡水水体和海洋中,由于营养盐、温度、水文等条件的改变,导致一些藻类、原生动物或细菌突发性地增殖或聚集,短时间内达到相当高的密度并引起水体变色,这种生态现象被称为赤潮。其中部分赤潮的暴发会危害到自然生态系统安全和人类健康,这类赤潮被称为有害赤潮(Harmful Algal Blooms, HABs)[1]。一部分有害赤潮藻类可以生物合成毒素,通过食物链的生物放大作用(如贝类等滤食后毒素可在其体内积累),最终对顶端的鱼类、哺乳动物和人类构成危害,其中严重者还会引发死亡。

根据传播媒介和造成的中毒症状,赤潮毒素分为以下几类:麻痹性贝毒(Paralytic Shellfish Poisoning, PSP)、腹泻性贝毒(Diarrhetic Shellfish Poisoning, DSP)、记忆缺失性贝毒(Amnesic Shellfish Poisoning, ASP)、神经性贝毒(Neurotoxic Shellfish Poisoning, NSP)和西加鱼毒(Ciguatera Fish Poisoning, CFP)。其中麻痹性贝毒是分布最广、危害最大的一类赤潮毒素,使人中毒的范围在 600 ~ 5 000 MU(MU 是毒力单位,1 MU 定义为 18 ~ 22 g 小白鼠在 15 min 内死亡的毒力),致死量是 3 000 ~ 30 000 MU。人类在误食染毒贝类 30 min 后,唇、舌头和脸有刺痛和灼烧的感觉,渐渐地扩展到脖子、手臂、手指、腿和脚趾,接着感到麻木,导致移动都很困难,如果引起呼吸系统的麻痹,12 h 内可能会导致死亡。麻痹性贝毒已经被列为贝类产品的常规检测指标之一。石房蛤毒素作为主要的麻痹性贝毒种类之一,已被收入联合国《化学武器公约》中禁止化学品的第二类清单。麻痹性贝毒生物合成机制的研究则已成为诸多赤潮研究方向中的一个热点,在产毒的环境调控机理、生物合成途径和基因遗传学研究等方面均已开展了许多工作。笔者将分别介绍麻痹性贝毒生物合成机制的重大研究进展和蛋白组学在该研究中的应用。

1　麻痹性贝毒的生物合成途径

1.1　生物化学合成途径　麻痹性贝毒是一类嘌呤衍生物,目前已发现 20 多种,包括甲藻、蓝藻、红藻和细菌在内的部分生物可以合成该类毒素[2]。研究已证明,嘌呤并非麻痹性贝毒生物合成的前体。Shimizu 等通过在培养产毒蓝藻时,喂养稳定同位素 ^{13}C 和 ^{15}N 标记的小分子有机物,培养后提纯毒素进行核磁共振分析,发现是由乙酸(acetate)、精氨酸(arginine)、腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine)以及其他未知的化合物通过一条未知的途径先合成石房蛤毒素,后或再经过其他修饰酶的作用转化为其他种类的麻痹性贝毒[3-4]。Shimizu 等还提出了一个可能的关键步骤:一个乙酸单元或衍生物与精氨酸或其前体在 α 碳上的 CLAISEN 聚合[5]。这个步骤完善了 Chevolot 提出的精氨酸前体理论[6],使精氨酸或其前体的结构可以完整地合并入毒素分子中,同时符合试验的观测结果。Shimizu 等研究发现了毒素分子环状结构中所有碳分子的来源。Kellmann 等对产毒蓝藻 *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 提取蛋白进行体外试管试验,发现石房蛤毒素的生物合成前体是乙酸、精氨酸、腺苷甲硫氨酸、氨基甲酰磷酸(carbamoyl phosphate),参与合成的酶都来自于细胞质组分,同时试验中所需的一种未知的辅酶,可以使用极性溶液从膜组分中提取到[7]。

1.2　遗传进化　Kellmann 等在 *C. raciborskii* T3 中发现了一组命名为 *sxt* 的基因簇,其中包含 26 个基因(蛋白),执行 30 种催化功能[8]。其中基因 *sxtA* 控制着 4 种蛋白(sxtA1 ~ sxtA4)的表达,催化石房蛤毒素生物合成关键的起始步骤的进行。sxtA1 类似于腺苷甲硫氨酸甲基转运酶;sxtA2 类似于一种 N-乙酰基转移酶(GNAT),负责从乙酰辅酶 A 中获取乙酸;sxtA3 类似于一种酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP);sxtA4 与一种氨基转移酶(class II aminotransferases)和另一种蛋白 AONS (8-amino-7-oxononanoate synthase)的功能类似,其功能包括执行胺基的 CLAISEN 聚合。*sxtI* 类似于一种氨甲酰基转运酶(Carbamoyltransferase),功能是将氨基甲酰磷酸合成入毒素分子中。石房蛤毒素生物合成的假想过程见图 1。

在此基础上,Moustafa 等利用 *sxt* 基因簇(含 26 个推定的基因)作为模板或"饵",通过全基因组测序、16S rRNA 分析、RAST 快速标注、发生树分析等技术,研究在产毒蓝藻(STX +)、不产毒蓝藻(STX -)和其他非蓝藻产毒生物如细菌、甲藻之间的同源和进化关系[9]。结果发现,26 个目标基因中有 17 个的起源是来自蓝藻自身,这 17 个中有 4 个(Group I)属于 STX + 和 STX - 所共有,另外 13 个只存在于

作者简介　李谷静(1984 -),女,江西景德镇人,硕士,从事赤潮科学研究。
收稿日期　2011-04-20

STX + 中,这 13 个基因包括 O-carbamoyltransferase、Sulfotransferase、Acyl-CoA N-acyltransferase、Saxitoxin-binding protein 等;还有 9 个基因属于非蓝藻起源,其中 5 个起源于变形细菌(Proteobacteria),它们包括 Cytidine deaminase、Amidinotransferase、Phytanoyl-CoA dioxygenase、Chaperone-like protein 和 1 个未知基因;而关键的 *sxtA* 基因,BLAST 搜索发现其有 2 个起源,前面的 800 个氨基酸序列与 *Myxococcus xanthus*(一种 δ-变形细菌)的 Polyketide synthase 基因是同源的,后 390 个氨基酸序列与 *Frankia* sp.(一种放线细菌)的 class I & II aminotransferase 基因是相似的。STX + 的某个祖先获取这些基因的方式为水平基因传递(horizontal gene transfer,HGT)和基因融合。

蓝藻和甲藻都有部分种可产生石房蛤毒素,但在进化上它们属于多源起源。石房蛤毒素的生物合成机制为何会独立地发生于 2 个不同的类群,一种假设是甲藻从蓝藻或其他细菌处通过 HGT 或其他方式获得这些基因,另一种假设是甲藻体内的细菌共生体是石房蛤毒素的主要贡献者。这可能是未来该领域学者研究的一个重要方向。

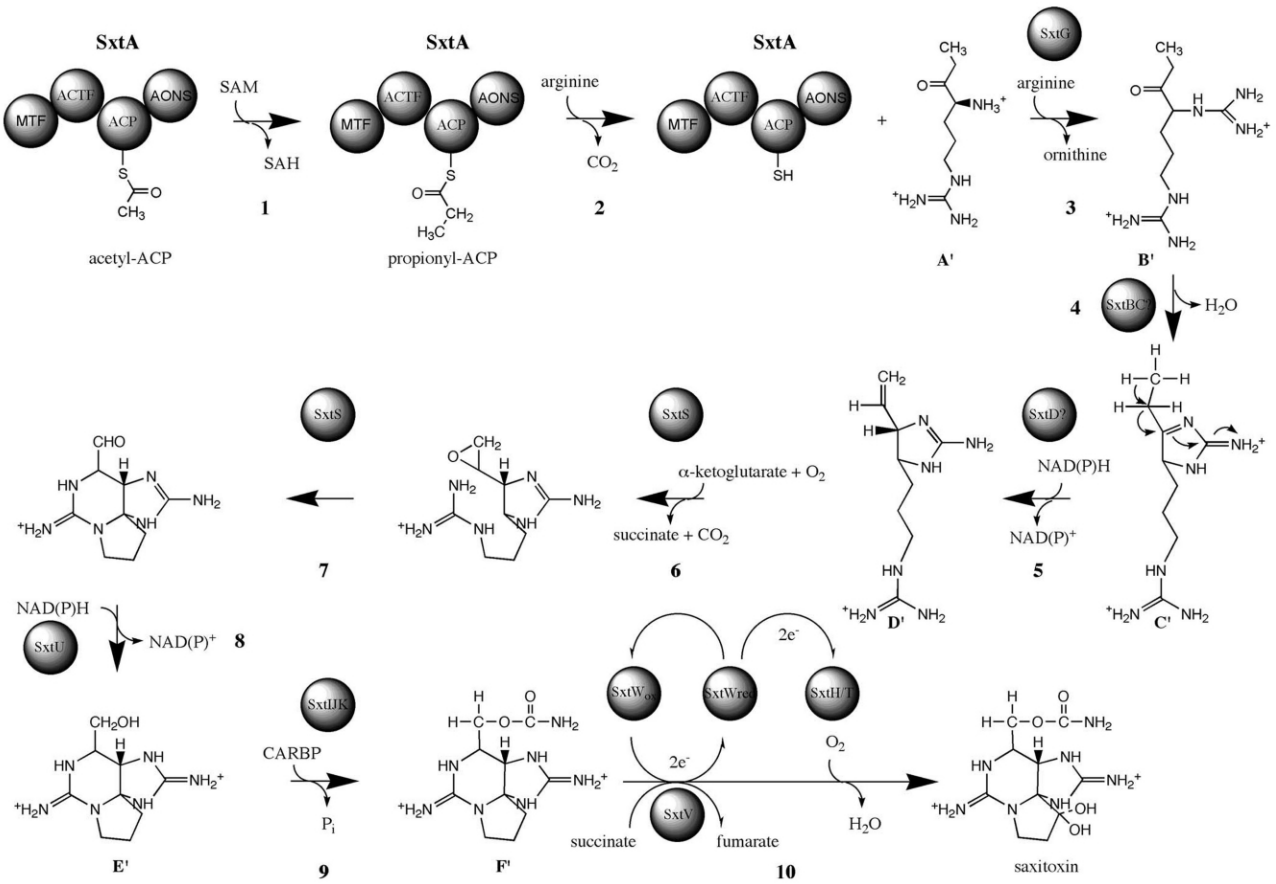

图 1 麻痹性贝毒合成途径和 *sxt* 基因簇功能的假想过程[8]

Fig. 1 Putative pathway of STX biosynthesis and functions of *sxt* gene cluster

2 蛋白组学方法在甲藻麻痹性贝毒生物合成途径研究中的应用

甲藻是海洋中一类非常重要的赤潮原因种,由其引发的赤潮每年都造成水产养殖业重大的经济损失,并引发一系列的生态问题。甲藻的基因组是人类的 50 倍,目前尚无全基因组测序的株系,再加上其特殊的生理特性,传统的研究方法并不适用。Williams 等提出的蛋白组学(Proteomics)的研究对象是整个基因组所表达的蛋白质。同一基因组,在不同组织和细胞中的蛋白质表达情况各不相同,在不同发育阶段、生理条件甚至环境的影响下,其蛋白质的表达情况也不相同。蛋白质是生命功能的直接承载者,通过蛋白组学的研究,可以对细胞生命活动规律进行直接的解析。在甲藻的研究中,蛋白组学是一种非常适合的方法。蛋白组学研究的三大基本支撑技术为双向电泳技术、计算机图像分析与数据处理技术以及生物质谱技术,这些技术在近些年得到了迅速的发展,进而推动了蛋白组学的发展。

Chan 等将蛋白组学率先应用到有害赤潮的研究,建立起了适用于有害赤潮研究领域的蛋白组学方法,发现了一系列种间指示蛋白和生长周期指示蛋白,并初步筛选到一组有毒亚历山大藻特有蛋白——T1 和 T2 蛋白,它们只在有毒藻中存在,在无毒藻中未发现,蛋白表达量与毒素含量存在一定的相关性,推测可能直接参与毒素的合成[10-14]。NAP50 是 Lee 等在对亚历山大藻 *Alexandrium affine* 的研究中发现的一个 50 kD 的特殊蛋白,在氮缺乏的条件下 24 ~ 36 h,RuBiSCOII 和 NAP50 同时发生下调;如果在蛋白下调前(24 h 之前)进行氮补充,下调会被阻止;在蛋白下调后(36 h 后),进行氮补充,RuBiSCOⅡ和 NAP50 的表达也会恢复正常。同时对日周期、整个生长周期和磷营养盐富余及缺乏的不同条件下,RuBiSCOII 和 NAP50 的表达进行研究,发现这两种蛋白并没有发生量上的变化,而保持一个常数,Lee 等认为 RuBiSCOⅡ和 NAP50 表达的变化是对氮吸收代谢过程发生变化的一种特异性反应[15]。而营养盐条件如氮的组成和浓度,被

认为是甲藻产毒的重要环境调控因素之一。

3　结语

麻痹性贝毒是一种分布最广、危害最大的赤潮毒素，它对水产养殖、水域生态和人类健康造成了重大危害。麻痹性贝毒的生物合成机制一直是赤潮研究的一个重要领域，通过众多学者的努力，对其中一类产毒生物蓝藻的生物合成机制有了较为深入的了解，取得了丰硕的成果。但对于另一类重要产毒生物甲藻来说，研究刚刚处于起步阶段，蛋白组学的应用则为甲藻的研究提供了非常有力的工具，这将成为未来赤潮研究最为热门的领域之一。

参考文献

[1] 齐雨藻，邹景忠，梁松，等. 中国沿海赤潮 [M]. 北京：科学出版社，2003.
[2] PLUMLEY F G. Marine algal toxins：Biochemistry，genetics and molecular biology [J]. Limnol Oceanogr，1997，42(5)：1252－1264.
[3] SHIMIZU Y，GUPTA S，PRASAD A V K. Biosynthesis of dinoflagellate toxin [C] //GRANELI E，SUNDSTROM B，EDLER L，et al. Toxic marine phytoplankton. New York：Elsevier，1990：62－73.
[4] SHIMIZU Y. Microalgal metabolite [J]. Chem Rev，1993，93：1685－1698.
[5] SHIMIZU Y，MANUEL N，AKIRA H，et al. Biosynthesis of saxitoxin analogues：The unpexpected pathway [J]. J Am Chem Soc，1984，106(21)：6433－6434.
[6] CHEVOLOT L. Marine natural products，chemical and biological perspectives [M]. New York：Academic Press，1981：53－68.
[7] KELLMANN R，NEILAN B. Biochemical characterization of paralytic shellfish toxin biosynthesis *in vitro* [J]. J Phycol，2007，43：497－508.
[8] KELLMANN R，MIHALI T K，JEON Y J，et al. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria [J]. Appl Environ Microbiol，2008，74：4044－4053.
[9] MOUSTAFA A，LORAM J E，HACKETT J D，et al. Origin of saxitoxin biosynthetic genes in cyanobacteria [J]. PLoS ONE，2009，4(6)：5758.
[10] CHAN L L，LO S C L，HODGKISS I J. *Proteomic study* of a model causative agent of harmful red tide，*Prorocentrum triestinum* I：Optimization of sample preparation methodologies for analyzing with two-dimensional electrophoresis [J]. Proteomics，2002，2：1169－1186.
[11] CHAN L，HODGKISS I J，LU S，et al. Use of two-dimensional electrophoresis *proteome reference* maps of dinoflagellates for species recognization of causative agents of harmful algal blooms [J]. Proteomics，2004，4：180－192.
[12] CHAN L，HODGKISS I J，WAN J M，et al. Proteomic study of a model causative agent of harmful algal blooms，*Prorocentrum triestinum* II：The use of differentially expressed protein profiles under different growth phases and growth conditions for bloom prediction [J]. Proteomics，2004，4：3214－3216.
[13] CHAN L，HODGKISS I J，LAM P K S，et al. Use of 2-DE to differentiate morphospecies of *Alexandrium minutum*，a paralytic shellfish poisoning toxins (PST)-producing dinoflagellate of harmful algal blooms [J]. Proteomics，2005，5：180－192.
[14] CHAN L，SIT W H，LAM P K S，et al. Identification and characterization of a "biomarker of toxicity" from the proteome of the paralytic shellfish toxin-producing dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophycease) [J]. Proteomics，2006，6：654－666.
[15] LEE F W F，DAVID M，SAMUEL C L C. Identification of two plastid proteins in the dinoflagellate *Alexandrium affine* that are substantially down-regulated by nitrogen-depletion [J]. J Proteome Res，2009，8 (11)：5080－5092.

(上接第 12242 页)

和组织 Na^+-K^+-ATP 酶活性的影响 [J]. 吉林农业大学学报，2007，29(5)：576－580.
[44] OISEN Y A，REITAN L J，ROED K H. Gill Na^+-K^+-ATPase activity，plasma cortisol level，and non-specific immune response in Atlantic salmon (salmo salar) during parr-smolt transformation [J]. Fish Biol，1993，43(4)：559－573.
[45] 梁妹，叶富良. 盐度对尼罗罗非鱼血清甲状腺素浓度和成活率的影响 [J]. 广东海洋大学学报，2007，27(3)：33－37.
[46] MANCERA J M，McCORMICK S D. Influence of cortisol，growth hormone，insulin-like growth factor I and 3，3'，5-triiodo-L-thyronine on hypoosmoregulatory ability in the euryhaline teleost Fundulus heteroclitus [J]. Fish Physiology and Biochemistry，1999，21：25－33.
[47] 左映平，曹劲松. 鱼类体内催乳素的渗透调节作用 [J]. 生命的化学，2007，27(5)：455－457.
[48] PISAM M，AUPERIN B，PRUNET P，et al. Effects of prolactin on alpha and beta chloride cells in the gill epithelium of the salt-water adapted tilapia "Oreochromis niloticus" [J]. Anat Rec，1993，235(2)：275－284.
[49] IWAMA G K，TAKEMURA A，TAKANO K. Oxygen consumption rates of tilapia in fresh water，sea water and hypersaline sea water [J]. Fish Biol，1997，51(5)：886－894.
[50] MADSEN S S，BERN H A. Antagonism of prolactin and growth hormone impact on seawater adaptation in two salmonids，Salmon trutta and *Oncorhynchus mykiss* [J]. Zool Sci，1992，4：775－784.
[51] SAKAMOTO T，SHEPHERD B S，MADSEN S S，et al. Osmoregulatory actions of growth hormone and prolactin in an advanced teleost [J]. Gen Comp Endocrinol，1997，106(1)：95－101.
[52] SINGER T D，CLEMENTS K M，SEMPLE J W，et al. Seawater tolerance and gene expression in two strains of Atlantic salmon smolts [J]. Can J Fish Aquat Sci，2002，59：125－135.
[53] DEANE E E，WOO N Y S. Differential gene expression associated with euryhalinity in sea bream (Sparussarba) [J]. Am J Physiol，2004，287：1054－1063.
[54] YOUNG G，BJORNSSON B T，PRUNET P，et al. Smoltification and seawater adaptation in coho salmon (Oncorhynchus kisutch)：Plasma prolactin，growth hormone，thyroid hormones，and cortisol [J]. General and Comparative Endocrinology，1989，74(3)：335－345.
[55] FOSKETT J K，SCHEFFEY C. The chloride cell：Definitive identification as the salt-secretory cell in teleosts [J]. Science，1981，215(4529)：164－166.
[56] 侯彦峰，张照斌，胡建英. 皮质醇影响青鳉鳃内钠钾酶基因表达的研究 [J]. 生态毒理学报，2009，4(2)：212－217.
[57] HWANG P P，FANG M J，TSAI J C，et al. Expression of mRNA and protein of Na^+-K^+-ATPase α subunit in gills of tilapia (Oreochromis mossambicus) [J]. Fish Physiology and Biochemistry，1998，18：363－373.
[58] LUCKE G，CUTLER C P，SANDERS I，et al. Na^+-K^+-ATPase expression in the euryhaline European eel (*Anguilla anguilla*) during acclimation to seawater [J]. J Physilo Lond，1993，459：105.
[59] MADSEN S S，JENSEN M K，NHR J，et al. Expression of Na^+-K^+-ATPase in the brown trout，Salmo trutta：in vivo modulation by hormones and seawater [J]. Am J Physiol，1995，269：R1339－1345.
[60] LEE T H，FENG S H，LIN C H，et al. Ambient salinity modulates the expression of sodium pumps in branchial mitochondria-rich cells of *Mozambique tilapia*，*Oreochromis mossambicus* [J]. Zool Sci，2003，20：29－36.
[61] D'COTTA H，GALLAIS C，SAULIER B，et al. Comparison between parr and smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) α subunit gene expression of Na^+-K^+-ATPase in gill tissue [J]. Fish Physiol Biochem，1996，15：29－39.
[62] TINE M，de LORGERIL J，PANFILI J，et al. Growth hormone and Prolactin-I gene transcription in natural populations of the black-chinned tilapia Sarotherodon melanotheron acclimatised to different salinities [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol，2007，147(3)：541－549.
[63] KYUNG MI LEE，TOYOJI KANEKO，FUMI KATOH，et al. Prolactin gene expression and gill chloride cell activity in fugu Takifugu rubripes exposed to a hypoosmotic environment [J]. General and Comparative Endocrinology，2006，149：285－293.
[64] McCORMICK S D，SAKAMOTO T，HASEGAWA S，et al. Osmoregulatory actions of insulin-like growth factor-I in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. J Endocrinol，1991，130(1)：87－92.
[65] MADSEN S S，BERN H A. In-vitro effects of insulin-like growth factor-I on gill Na^+-K^+-ATPase in coho salmon，*Oncorhynchus kisutch* [J]. Endocrinol，1993，138(1)：23－30.